



## MDM4高発現消化器癌におけるMDM4・MDM2の同時ノックダウンによる5FUの効果増強について

著者	今西 真実子
内容記述	この博士論文は内容の要約のみの公開（または一部非公開）になっています
発行年	2019
学位授与大学	筑波大学 (University of Tsukuba)
学位授与年度	2018
報告番号	12102甲第9177号
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2241/00156464">http://hdl.handle.net/2241/00156464</a>

# 論 文 概 要

○論文題目：

MDM4 高発現消化器癌における *MDM4・MDM2* の同時ノックダウン  
による 5FU の効果増強について

○指導教員

人間総合科学研究科 疾患制御医学専攻 兵頭一之介 教授

(所 属) 筑波大学大学院 人間総合科学研究科 疾患制御医学専攻

(氏 名) 今西 真実子

目 的：5-FU は胃、大腸癌を含む様々な癌に対して有効とされているが、しばしば効果は十分でなく、また抵抗性を示すこともある。これらの問題を解決するために新たな治療戦略が求められている。

癌抑制遺伝子の不活化は癌化に重要な役割を果たしており、中でも *TP53* 癌抑制遺伝子はその機能を抑制する様々な癌遺伝子があることが知られている。このような癌遺伝子として、*MDM2* 遺伝子とそのホモログである *MDM4* 遺伝子があるが、これらの発現が高い腫瘍では抗腫瘍剤への感受性の低下が報告されている。またその反面、これら癌遺伝子の機能抑制は p53 活性化を介した抗腫瘍効果を示し、治療への応用が期待されている。これまで我々は、野生型 *TP53* を有する様々な腫瘍培養細胞において合成オリゴ核酸からなる DNA 修飾キメラ型 siRNA (chiMDM4、chiMDM2) を細胞内に導入し RNAi 干涉によって *MDM2*・*MDM4* の発現を配列特異的に同時に抑制することで、高い抗腫瘍効果が得られることを報告してきた (Oncoscience 2014; 830-43)。

本研究では、野生型 *TP53* かつ *MDM4* 高発現である胃・大腸癌細胞株に対して chiMDM4、chiMDM2 を用いた *MDM4*・*MDM2* の同時ノックダウンによって 5-FU の抗腫瘍効果が増強できるか否かを検討し、さらに動物モデルを用いて chiMDM4+chiMDM2 の有効性と 5-FU を併用した場合の効果についても検証する。

方 法：野生型 *TP53* かつ *MDM4* 高発現である胃癌細胞株 2 種 (SNU-1、NUGC4) と大腸癌細胞株 2 種 (HCT116、LoVo) を用いて、chiMDM4+chiMDM2 及び 5-FU を投与し抗腫瘍効果の増強を WST-8 で検証した。また、免疫ブロット法による関連蛋白の発現解析とフローサイトメトリー (FACS) による細胞周期解析を行い、抗腫瘍効果増強の作用機序について検証した。さらに、培養細胞株実験で使用した大腸癌細胞株 (HCT116) を用いて皮下異種移植モデルを作成し、chiMDM4+chiMDM2 及び 5-FU を投与し動物モデルにおける抗腫瘍効果を検討した。

結 果：WST-8 では、すべての細胞株において *MDM4*・*MDM2* の同時ノックダウンにより 5-FU の抗腫瘍効果が増強することが確認できた。特に HCT116 では優れた相乗効果が認められた。NUGC4 にも相乗効果を認め、LoVo と SNU-1 は相加効果であった。免疫ブロット法では、各細胞における *MDM4*・*MDM2* のノックダウンや 5-FU 投与により誘導される p53、p21、PUMA の発現レベルの比較を行った。細胞別に関連蛋白発現の抑制あるいは増強の程度に違いは見られたが、いずれの細胞でも共通して *MDM4*・*MDM2* の同時ノックダウンと 5-FU の併用により p53 の発現増強が認められた。相乗効果を示した HCT116、NUGC4 と相加効果であった LoVo、SNU-1 を比較すると、MDM4 の発現抑制

レベルにおいて、相乗効果を示した 2 種細胞株の方が強い抑制を認めた。FACS による細胞周期解析では、*MDM4・MDM2* の同時ノックダウンにより G1 期の停止、5-FU の投与により早期 S 期の停止を認め、*MDM4・MDM2* の同時ノックダウンと 5-FU の併用により sub G1 期として観察されたアポトーシス細胞の増加と G1 期停止の増強を認めた。HCT116 の皮下異種移植腫瘍を作成して行ったマウスの *in vivo* 実験では、*MDM4・MDM2* の同時ノックダウンあるいは 5-FU の投与により腫瘍増殖は抑制され、これらを併用することで最も強い有意な腫瘍増殖抑制効果を認めた。

考 察：本研究では、野生型 *TP53* かつ *MDM4* 高発現である大腸癌、胃癌に対して *MDM4・MDM2* の同時ノックダウンが、5-FU の抗腫瘍効果を増強することを示した。5-FU は p53 を誘導すると同時にネガティブフィードバック機構により *MDM2* 発現を増強する。これを chiMDM4+chiMDM2 によりノックダウンすることにより、この機序を断ち切り併用効果を発揮するものと思われた。

細胞により 5-FU の抗腫瘍効果を chiMDM4+chiMDM2 が増強する程度が異なるのは、*MDM4* の抑制程度と関連していると考えられる。相乗効果が見られた HCT116、NUGC-4 では相加効果であった SNU-1、LoVo よりも 5-FU 投与による *MDM4* 抑制がより強く認められた。また、もともと *MDM4* の発現レベルは細胞毎に異なっており、相乗効果の見られた HCT116、NUGC-4 は、相加効果であった SNU-1、LoVo より *MDM4* の発現レベルが高く、これらの細胞では腫瘍増殖や生命維持を *MDM4* に、より強く依存している可能性が考えられた。chiMDM4+chiMDM2 と 5-FU の併用においては p53 の誘導とともに細胞周期の G1 期停止が生じており、これは使用した 4 種類のすべての細胞に共通して認められた。

5-FU の S 期の停止作用は HCT116 に顕著にみられたが、chiMDM4+chiMDM2 の併用では G1 期停止に収束していた。併用による p53 の強い誘導により 5-FU の細胞周期に関わる作用機序が変化する可能性が示唆された。

結 論： *TP53* 野生型かつ *MDM4* 高発現である消化器癌に対して *MDM4・MDM2* の同時ノックダウンは 5-FU の抗腫瘍効果を増強することが示され、5-FU と *MDM4・MDM2* をターゲットとした siRNA 薬の併用は新たな治療戦略となる可能性がある。